

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Мурманского морского биологического
института Российской академии наук
(ММБИ РАН), д.б.н.




Макаров М.В.

«август» 2024 г.

Отзыв ведущей организации на диссертационную работу Дьяковой Светланы Александровны «ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ ВОДЫ И ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ПРИГЛУБОЙ ЗОНЫ ЗАПАДНОЙ ЧАСТИ СЕВЕРНОГО КАСПИЯ», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.16. Гидробиология (биологические науки).

Результаты диссертационного исследования изложены на 135 листах текста, включая 34 рисунка, 7 таблиц, 7 приложений. Список литературы состоит из 248 источников, в том числе, 72 на иностранных языках. Приложения представлены данными по количественным характеристикам бактериальных сообществ исследуемой акватории (ОЧБ, количество культивируемых бактерий, количество бактерий, описанных автором групп), видовыми списками выделенных в культуру представителей бактериоценоза.

Рукопись диссертационной работы построена по стандартной схеме: Введение, с актуальностью и научной новизной, теоретической и практической значимостью диссертации, описанием личного вклада автора, апробацией работы и т.д.; литературный обзор; методическая часть; три главы, представляющие результаты проведенных исследований; заключение и выводы; список используемой литературы; приложения.

Автором был обработан обширный материал (более 500 проб), выделено более 2000 изолятов из объектов окружающей среды,

проанализированы полученные результаты. Материал для исследований отбирался в северной части Каспийского моря.

Данная акватория является зоной антропогенного воздействия. Здесь находятся, активно осваиваются и эксплуатируются нефтегазовые месторождения. Район характеризуется развитым судоходством. В то же время, данная акватория является районом нагула молодежи многих видов рыб. Антропогенная нагрузка может значительным образом сказываться на структурных и функциональных особенностях водных экосистем. Одними из первых, даже при незначительном изменении качества среды под воздействием различных факторов, реагируют, как правило, микробные сообщества. Эти реакции могут проявляться в виде изменений в таксономической структуре сообщества, общей численности бактерий, численности культивируемых представителей, количества и соотношения микроорганизмов (в данном случае, бактерий) различных трофических групп. Изучение указанных показателей бактериальных сообществ играют важную роль в мониторинге среды, а результаты таких исследований позволяют оценить и спрогнозировать вектор развития, как микробных сообществ, так и экосистемы, в целом. Имеющиеся угрозы аварийных разливов нефтепродуктов поднимают вопрос поиска и использования штаммов бактерий, способных эффективно участвовать в деструкции подобного рода загрязнителей, для их возможного использования в ремедиации нефтезагрязненных районов. Поэтому актуальность данного и подобных исследований не вызывает сомнений, что и отражено в соответствующем разделе.

Исходя из этого, автором четко сформулирована и обоснована цель, и поставлены задачи для ее успешного достижения.

Несмотря на достаточно обширный литературный материал по рассматриваемой проблеме, комплексные работы, посвященные исследованию микробных сообществ указанной акватории, практически не проводились. Это затрудняет понимание процессов, происходящих в микробных сообществах и формирование цельной картины бактериоценозов

пелагиали и бентали Северного Каспия. Научная новизна работы заключается в том, что автором впервые получены комплексные данные о количественных характеристиках пелагических и бентосных бактериальных сообществ (в том числе их сезонной динамике), позволяющие детализировать картину микробных ценозов в исследуемой акватории. Особое внимание уделяется культивируемым углеводородокисляющим бактериям. Выделен штамм, относящийся к роду *Rhodococcus*, демонстрирующий высокую углеводородокисляющую способность в отношении нефти и некоторых ее фракций.

Говоря о теоретической и практической значимости диссертации можно отметить, что полученные автором данные могут лечь в основу разработки критериев оценки состояния среды при регулярных мониторинговых исследованиях акватории Северного Каспия, что позволит внести значимый вклад в углубление понимания роли бактерий (особенно бентосных) в самоочищении водной среды морей юга России.

В первой главе приведен обзор литературы, в котором в историческом аспекте рассматривается проблема исследования пелагических и донных бактерий в северной части Каспийского моря. Согласно литературным данным, описаны особенности гидрологического и гидрохимического режимов, характерных для указанного района моря. Приведены особенности количественного распределения бактерий (ОЧБ, культивируемых гетеротрофов, углеводородокисляющих бактерий) в Каспийском море. В целом, описаны бактерии-деструкторы нефти и нефтепродуктов с точки зрения их перспективности при использовании в ремедиации морской среды. Рассмотрена значимость исследования микробных сообществ в мониторинге морской среды.

Резюмируя обзор, автор верно указывает, что хозяйственная деятельность, затрагивающая морские экосистемы определяет актуальность регулярных мониторинговых наблюдений, включающих исследование как количественных, так и качественных показателей микробного сообщества. А потенциальные риски аварийных разливов нефти и нефтепродуктов при их

добыче и транспортировке, заставляют искать новые технологии и методы борьбы с ними, основанными на использовании микроорганизмов.

Вторая глава, посвящена описанию методов, используемых автором при проведении исследований. Представлена документальная база (ГОСТ, ПНДФ, журнальные публикации), регламентирующая их проведение. Описаны «классические» и современные методы микробиологии, биохимии и химии (определение нефтяных углеводов), использованные при работе с объектом. Указаны статистические методы обработки данных. В основном, это стандартные методы вариационной статистики и корреляционный анализ с использованием программных пакетов MS Excel и STATISTICA.

В главах 3, 4 и 5 представлены результаты исследований и проведен их анализ.

Глава 3 затрагивает вопросы количественных характеристик бактериальных сообществ, включая ОЧБ, культивируемые бактерии, УОБ, а так же соотношение исследуемых групп в сообществе. Полученные результаты позволили оценить трофность исследуемой акватории и ее изменение по сезонам года.

В Главе 4 описаны выделенные на питательных средах представители бактериоценоза. Показана их доля среди других представителей культивируемой части сообщества. Интересным является факт, что в сезонном аспекте доминирующие формы в составе культивируемой части сообщества не менялись. Основным представителем данной группы бактерий во все исследуемые сезоны года были бактерии рода *Pseudomonas*.

Отдельного внимания заслуживает информация о наличии в сообществе санитарно-показательных микроорганизмов, проявляющих патогенные свойства. При этом основным фактором патогенности у них является протеолитическая активность. Многие выделенные штаммы, при этом проявляли высокую устойчивость к некоторым антибиотикам. Данное явление может свидетельствовать о неблагоприятной санитарно-экологической обстановке в районе исследований. Автор связывает подобную картину с антропогенной нагрузкой на акваторию.

Глава 4 по нашему мнению представляет особый интерес с точки зрения прикладного аспекта. Выделение бактерий рода *Rhodococcus* в качестве деструкторов нефти не является чем-то удивительным. Представители данного рода давно известны как бактерии, способные принимать активное участие в биодеструкции как нефти и нефтепродуктов, в целом, так и отдельных углеводов. Скорость и полнота данного процесса зависит от множества факторов. Наряду с представителями данного вида к активным деструкторам нефтепродуктов, могут относиться также представители родов *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Ochrobactrum*, *Bacillus*, *Arthrobacter* и т.д. Описана также роль цианобактерий в этом процессе. Однако интересным является факт, что представитель рода показал максимальную способность к деструкции нефти и отдельных ее фракций. Вероятно это особенность данного представителя сообщества, обитающего в исследуемой акватории, либо прослеживается влияние экспериментальных условий культивирования в присутствии нефтяных углеводов.

Выводы и заключение соответствуют целям и задачам и отражают основные результаты проведенного исследования. Список литературы исчерпывающий.

К работе есть и ряд уточнений, вопросов и замечаний, в том числе, и достаточно серьезных.

В тексте рукописи имеются некоторые стилистические погрешности, а также некоторые особенности структурирования результатов затрудняющих понимание (см. ниже).

1. Название диссертации и цель исследования.

И в названии, и в цели, заявлено определение особенностей функционирования бактериальных сообществ. Однако непосредственно о функционировании в тексте диссертации речи не идет. Вопросы функционирования, на наш взгляд, частично отражает только та часть диссертации, в которой приводится информация по физиологическим свойствам выделенных микроорганизмов а также раздел по

углеводородокисляющей способности бактерий. И это в лабораторных условиях. В природе, бактерии могут вести себя иначе. Лучше было бы вообще убрать слово «функционирование», это бы пошло только на пользу. Т.е. «ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ ВОДЫ И ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ПРИГЛУБОЙ ЗОНЫ ЗАПАДНОЙ ЧАСТИ СЕВЕРНОГО КАСПИЯ». Тем более, эти особенности (ОЧБ, количество культивируемых бактерий, количество УОБ, их соотношение) в тексте достаточно хорошо описаны. Особый акцент автором делается на углеводородокисляющие бактерии.

2. В главе «Объекты и методы исследований» говорится, что для использования ассимиляционного потенциала среды использовался метод предложенный Зобеллом. Почему был выбран именно он, ведь существуют более точные методы, например, с использованием меченого углерода.

3. В той же главе описано определение биохимических свойств бактерий. Не ясно, с какой целью определялись эти свойства. В качестве предварительной идентификации перед анализом 16S рРНК?

4. Там же описаны методы «Определения способности микроорганизмов развиваться в присутствии различных концентраций тяжелых металлов». Однако в дальнейшем об этом ничего не говорится.

5. Описанные методы определения концентрации нефтяных углеводородов позволяют рассчитать валовое содержание нефтепродуктов в объекте среды (вода, грунт). При этом позже приводятся сведения о деструкции бактериальным штаммом отдельных фракций углеводородов. Непонятно, какие методы использовались во втором случае.

6. Для лучшего понимания следовало разделить результаты определения общей численности, численности культивируемых бактерий, УОБ и бактериальной деструкции по соответствующим пунктам и подпунктам.

7. По ходу рассмотрения результатов исследований автор не единожды ссылается на гидрохимические показатели среды. Однако, нигде нет детального описания результатов гидрохимических исследований. Отмечено, что данные были предоставлены «сотрудниками лаборатории водных проблем и токсикологии Волжско-Каспийского филиала ФГБНУ «ВНИРО» («КаспНИРХ»)).

В тексте обнаруживается только одна таблица (Табл. 3.1.1), в которой присутствуют сведения по содержанию фосфора, кремния и минерального азота. Автор проводит корреляцию между количественными показателями микробного сообщества и гидрохимическими показателями среды. При этом в таблице приведены среднегодовые значения указанных показателей за 2013-2018 годы, а количественные показатели бактериальных сообществ даны посезонно.

8. То же касается и описания речного стока.

9. Численность УОБ. Автор отмечает, что «способность бактерий использовать нефть в качестве единственного источника углерода не свидетельствует непосредственно о наличии нефтяного загрязнения, скорее указывает на лабильность бактерий в отношении различных источников питания». И с этим невозможно спорить. В ходе исследования автор связывает численность УОБ с гидрохимическими показателями (минеральный азот, фосфор, кремний), а углеводородокисляющий потенциал рассчитывает по методу, предложенному Зобеллом (см. выше). При этом данный метод может не учитывать особенностей среды, таких как температура, соленость, освещенность, что важно, если мы говорим, например, о цианобактериях, концентрация биогенов, наличие/отсутствие течений. Он только позволяет определить потребление нефтяных углеводородов сообществом по рассчитанному потреблению углеводородов одной клеткой, которое так же может различаться в зависимости от условий. Данный метод можно назвать теоретическим. В контексте же проведенного исследования, с практической точки зрения, гораздо показательнее было бы

измерить содержание углеводов в среде. Вот тогда с большой долей уверенности и можно было бы утверждать, что в данном конкретном случае численность бактерий определяется не количеством углеводов, а той же аллохтонной или аутохтонной органикой.

10. Не понятно, по какой методике проводили гранулометрический анализ грунта. Опять же, не ясно, проводили этот анализ сами или использовали данные из открытых источников. Данный аспект имело бы смысл отразить в методической части работы.

11. Биоразнообразиие. Насколько употребимо сочетание бактериальное биоразнообразиие?

12. Так же как и в случае с количественными показателями, результаты определения разнообразия в бактериальных сообществах лучше было бы отделить от биохимических свойств бактерий, культивированных на питательных средах. Используемое обобщение сильно затрудняет понимание. Читаешь материал по биоразнообразию, в том числе и УОБ, и сразу же, следующим абзацем, идет описание санитарно-показательных микроорганизмов и их свойств, затем опять переход на разнообразиие и определение индексов. Хотя определение индексов разнообразиие для отдельных групп бактерий вызывает интерес.

13. Не совсем понятно, откуда были получены изоляты для определения углеводородокисляющей способности бактерий. Получается из достаточно большого количества КОЕ, выросших на агаре при определении количества УОБ, было выделено только пять изолятов. И только один из них сохранял рост в среде с добавлением углеводорода. При этом в списках Приложения Б указано гораздо большее число родов и, соответственно, должно быть еще большее число видов. Хотя, это могли быть отдельные, не связанные с работами по определению численности УОБ эксперименты, направленные на изучение конкретной проблемы. Не ясно.

В экспериментальных исследованиях, проведенных ранее группой Коронелли/Ильинского, было показано, что родококки и псевдомонады доминируют среди культивируемых бактерий на начальном этапе загрязнения нефтью. При переходе загрязнения в хроническую фазу, основными культивируемыми бактериями становятся представители родов *Acinetobacter* и *Arthrobacte*. Родококки же сохраняются в качестве культивируемых доминантов при загрязнении среды дизельным топливом. Из литературных данных известно, что родококки являются одними из самых «известных» деструкторов нефтяных углеводородов. Но из текста представленной работы не совсем понятно проводилось ли сравнение бактерий рода *Rhodococcus* с другими выделенными из акватории представителями сообщества (не псевдомонадами из числа пяти изолятов) в плане их способности к деструкции нефтяных углеводородов в конкретно данном случае. Большая часть бактерий, представленная в списках в Приложении Б, согласно литературным источникам, затрагивающих вопросы экологии УОБ, способна принимать участие в деструкции нефти, нефтепродуктов и отдельных их фракций. И доля таких бактерий среди культивируемой части сообщества может достигать 80% и более. Учитывая написанное выше, не уместнее ли было провести подобную работу с другими бактериями рода *Pseudomonas*? Особенно, учитывая тот факт, что они были доминантами в культивируемом сообществе независимо от сезона года.

14. По выводам. См. замечание 7 и 8.

Четвертый вывод имело бы смысл разделить на два. В одном описать сезонные особенности таксономии культивируемой части бактериального сообщества, в другом – факторы патогенности.

15. Приложение Б. Видовой состав культивируемой части сообщества. В таблицах приведены только названия родов. Вернее было бы написать «списки родов».

Как уже было сказано выше, есть и достаточно серьезное замечание.

16. Первое, что бросается в глаза при прочтении глав с результатами исследования, это «бедное» обсуждение. Можно было более детально провести сравнение полученных данных с результатами предыдущих исследований, представленных в открытой печати. Возможно, касаясь данной акватории сведений недостаточно, но можно было сравнить с тем, что есть в печати и что автор использовал в обзоре литературы. Например, работа Буткевич. Кроме того в открытой научной печати достаточно материала по бактериям южных морей, в том числе углеводородокисляющих. Взять хотя бы работы уже упомянутой выше группы Коронелли/Ильинского. Тем более, ссылки на этих авторов представлены в списке литературы.

Диссертация, в целом, оставляет положительное впечатление, а указанные замечания не умаляют ее значимости. Несмотря на выше изложенное, работа выполнена на достаточно высоком уровне и является законченным научным исследованием. Полученные результаты углубляют и развивают представление о микробных сообществах северной части Азовского моря.

Основные результаты исследования доложены на научных конференциях, опубликованы в рецензируемых изданиях, в том числе, индексируемых в международных базах данных, и, удовлетворяющим требованиям ВАК РФ.

Содержание и структура автореферта полностью отражает содержание и структуру рукописи.

Диссертационная работа «ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ ВОДЫ И ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ПРИГЛУБОЙ ЗОНЫ ЗАПАДНОЙ ЧАСТИ СЕВЕРНОГО КАСПИЯ» соответствует п. 9 Положению о порядке присуждения ученых степеней, утвержденному Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 года № 842, а ее автор – Дьякова Светлана Александровна заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.16. Гидробиология (биологические науки).

Отзыв на диссертацию заслушан и обсужден на заседании расширенного семинара лаборатории альгологии Мурманского морского биологического института РАН, Протокол № 19 от 02 августа 2024 года. Присутствовали на заседании 12 человек. Голосовали: за – 12, против – 0, воздержался – 0.

Заведующий лабораторией альгологии

ММБИ РАН, д.б.н., профессор


Воскобойников Г.М.

/Воскобойников Григорий Михайлович/

Старший научный сотрудник лаборатории

альгологии ММБИ РАН, к.б.н.


Пуговкин Д.В.

/Пуговкин Дмитрий Витальевич/

Подпись зав. лабораторией альгологии ММБИ РАН
Воскобойникова Г.М и с.н.с. лаборатории альгологии Пуговкина Д.В.
заверяю

Начальник отдела кадров


Фомина Е.П.



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Мурманский морской биологический институт

Российской академии наук (ММБИ РАН)

183038, Мурманск,

ул. Владимирская, д. 17, Россия

Тел.: (8152) 25-39-63

Факс.: (8152) 25-39-94

Email: mmbi@mmbi.info и murman-mmbi@yandex.ru

Сайт: mmbi.info